

论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.05.005

网络首发 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20191114.1659.009.html>(2019-11-14)

结肠癌组织中 AGR2、S100A4 的表达及与临床病理特征及预后的关系^{*}

傅家欣,徐 瑛,高志斌
(浙江省余姚市人民医院病理科 315400)

[摘要] **目的** 探讨前梯度蛋白 2(AGR2)、S100 钙结合蛋白 A4(S100A4)在结肠癌组织中的表达情况及与结肠癌的临床病理特征和预后的关系。**方法** 选取 2013 年 1 月到 2014 年 3 月该院确诊为结肠癌、管状绒毛状腺瘤患者为研究对象。采用 Western blot 检测 AGR2、S100A4 在结肠癌、管状绒毛状腺瘤及正常黏膜组织中的表达情况,并分析其与结肠癌患者的临床病理特征及预后的关系。**结果** AGR2、S100A4 在结肠癌表达显著高于管状绒毛腺瘤和正常肠黏膜组织,差异有统计学意义($P<0.05$)。在结肠癌患者中 AGR2 与 S100A4 呈正相关($r=0.534\ 4$, $P<0.01$),且与 Dukes 分期、淋巴结转移和组织分化程度相关($P<0.05$),与性别、年龄、肿瘤大小无关($P>0.05$)。AGR2 和 S100A4 低表达患者 5 年生存率分别为 57.14%和 53.06%,明显高于 AGR2、S100A4 高表达患者的 26.09%和 28.13%,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** AGR2 和 S100A4 在结肠癌中表达升高,与临床病理特征、预后密切相关。

[关键词] 前梯度蛋白 2;S100 钙结合蛋白 A4;结肠肿瘤;预后

[中图法分类号] R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2020)05-0709-05

Expressions of AGR2 and S100A4 in colon cancer and their correlations with clinical prognosis^{*}

FU Jiaxin,XU Ying,GAO Zhibin
(Department of Pathology,Yuyao Municipal People's Hospital,Yuyao,Zhejiang 315400,China)

[Abstract] **Objective** To study the expressions of AGR2 and S100A4 in colon cancer tissue and their relationship with the clinicopathological features and prognosis. **Methods** The patients diagnosed as colon cancer,tubular villous adenoma and normal intestinal mucosa in this hospital from January 2013 to March 2014 were selected as the study subjects. The expression levels of AGR2 and S100A4 in colon cancer,tubular villous adenoma and normal mucosa tissues were detected by Western blot. Then the relationship between AGR2 and S100A4 with clinicopathological features and prognosis was analyzed. **Results** The expression levels of AGR2 and S100A4 in colon cancer were significantly higher than those in tubular villous adenoma and normal intestinal mucosa tissue,and the difference was statistically significant ($P<0.05$). AGR2 was positively correlated with S100A4 in the patients with colon cancer ($r=0.534\ 4$, $P<0.01$),and correlated with the Dukes stage,lymph node metastasis and tissue differentiation degree ($P<0.05$),but had no correlation with the gender,age and tumor size ($P>0.05$). The 5-year survival rates in the patients with low expression of AGR2 and S100A4 were 57.14% and 53.06%,respectively,which were significantly higher than 26.09% and 28.13% in the patients with AGR2 and S100A4 high expression groups,and the difference was significant ($P<0.05$). **Conclusion** The expressions of AGR2 and S100A4 are increased in colon cancer,which are closely correlated to the clinicopathological features and prognosis.

[Key words] AGR2;S100A4;colon cancer;prognosis

结肠癌在我国的发病率及病死率在全中国恶性肿瘤中居第 5 位,且一直保持持续上升趋势^[1],虽然以手术、化疗等为主的治疗取得了较大的进步,但患者预后仍较差,究其原因多是患者发现及诊断结肠癌时已属于中晚期,错过了最佳治疗时机。因此对结肠癌发病机制进行深入研究,寻找可早期预警及提示预后

^{*} 基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2018ky936)。 作者简介:傅家欣(1983—),主管技师,本科,主要从事病理技术方面的研究。

的分子标志物尤为重要。前梯度蛋白 2(anterior gradient protein 2, AGR2)首先在人乳腺癌细胞株中被发现^[2],后又被证实在胃癌、胰腺癌、卵巢癌等多种肿瘤中高表达,在肿瘤的发展和转移中起到了一定的作用^[3-5]。S100 钙结合蛋白 A4(S100A4)属于 S-100 蛋白家族中的一种,可增加肿瘤细胞的运动及侵袭能力,促进细胞的异常增生及分化,也与多种肿瘤的发生发展密切相关^[6]。本文通过探讨 AGR2、S100A4 在结肠癌、管状绒毛状腺瘤及正常黏膜组织中的表达情况,分析二者与结肠癌临床病理特征和预后的关系,为结肠癌的诊断及预后提供一定依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2013 年 1 月到 2014 年 3 月本院行肠镜检查确诊为结肠癌、管状绒毛状腺瘤患者及同期行肠镜体检者的正常肠黏膜组织标本。纳入标准:(1)结肠癌及管状绒毛状腺瘤患者均行病理检查确诊;(2)结肠癌及管状绒毛状腺瘤患者均为首次诊断,未进行相关治疗;(3)所有研究对象资料完整;排除标准:(1)合并严重心、肝、肾功能不全者;(2)未获得知情同意和不能配合随访者。结肠癌患者 85 例,管状绒毛状腺瘤患者 78 例,健康体检者 88 例,所有组织标本均为肠镜下活检钳夹取组织获取,统计所有患者的临床病理资料。结肠癌组男 53 例,女 32 例,年龄 37~81 岁;肿瘤小于 5 cm 44 例,大于 5 cm 41 例;Dukes 分期:A 期 10 例,B 期 34 例,C 期 22 例,D 期 19 例;组织分化程度:低分化 21 例,中分化 48 例,高分化 16 例;有淋巴结转移者 41 例,无淋巴结转移者 44 例。结肠癌患者采取手术治疗者 66 例,管状绒毛状腺瘤患者均行内镜下手术治疗。对所有结肠癌组患者进行定期随访,随访时间为 6~60 个月,失访 4 例,失访患者以最后 1 次随访时间为准做删失处理。

1.2 试剂

RIPA 裂解液购自碧云天公司;BCA 蛋白定量试剂盒购自北京康为世纪公司;聚偏氟乙烯(PVDF)膜购自美国 Milipore 公司;蛋白 Marker 购自美国 Thermo 公司;低背景化学检测试剂盒购自北京康为世纪公司;GAPDH 抗体购自美国 Proteintech 公司;AGR2 抗体(ab209224)、S100A4 抗体(ab197896)购自英国 Abcam 公司;羊抗兔二抗购自中山金桥生物技术有限公司;Western blot 一抗、二抗去除液购自碧云天公司;DAB 试剂盒购自美国 Vector Laboratories 公司。

1.3 Western blot 检测 AGR2、S100A4 表达

所有标本均于-80℃冰箱中保存,按步骤提取组织标本蛋白,并通过 BCA 法测定蛋白浓度,根据测得蛋白浓度加入不同量的双蒸水使蛋白统一为相同的终浓度。加入蛋白上样缓冲液,煮沸使蛋白变性。然后按 Western blot 步骤进行操作,制作分离胶和浓缩

胶,待浓缩胶凝固后依次进行上样。所有标本按相同蛋白量进行上样,电泳(样品在浓缩胶时 90 V 电泳,样品进入分离胶后改为 120 V 电泳,待样品至分离胶边缘时终止电泳)、转膜(AGR2 为恒流 100 mA 30 min,S100A4 为 90 mA 35 min)、转膜结束后取出 PVDF 膜置于 5%的脱脂奶粉中进行封闭,4℃冰箱过夜封闭。封闭结束后用 PBST 液摇床上洗膜 3 遍,每次 5 min。洗膜后孵育一抗(AGR2 和 S100A4 抗体浓度为 1:100,内参 GAPDH 抗体浓度为 1:1000),4℃冰箱过夜后用 PBST 液摇床上洗膜 3 遍,每次 5 min。再孵育二抗(二抗浓度 1:2000),室温下孵育 2 h,后再用 PBST 液摇床上洗涤 3 遍,每次 5 min,洗涤后进行显色,用图像分析软件 IPP6.0 对图像进行灰度值测定。

1.4 结果判定

所有标本均进行 3 次 Western blot 检测,根据显色结果测定目的蛋白和内参 GAPDH 灰度值,共测定 3 次取平均值。计算 AGR2 和 S100A4 与内参 GAPDH 的相对表达水平,进行统计分析。

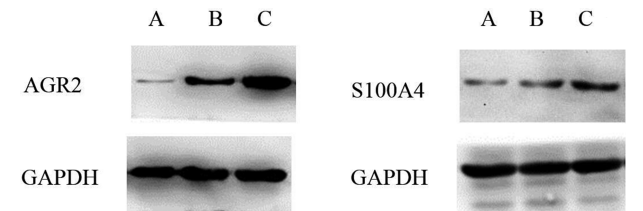
1.5 统计学处理

采用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,正态分布的计量资料用 *t* 检验,非正态分布采用秩和检验,计数资料及构成比的差异程度采用 χ^2 /Fisher 确切概率法检验;多组均数间比较采用方差分析;相关分析采用直线相关分析,计算 Pearson 相关系数。Kaplan-Meier 法进行生存曲线的描绘,Logrank 法检验生存分析差异,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AGR2、S100A4 在 3 组患者中的表达

结肠癌组织 AGR2 相对表达水平(0.75 ± 0.16)明显高于管状腺瘤(0.39 ± 0.09)和正常黏膜组织(0.24 ± 0.08),S100A4 在结肠癌中相对表达水平(0.78 ± 0.13)也明显高于管状腺瘤(0.41 ± 0.08)和正常黏膜组织(0.29 ± 0.07),且差异有统计学意义($t=13.28, P=0.000; t=14.17, P=0.000$),见图 1 和图 2。



A:正常肠黏膜;B:管状绒毛状腺瘤;C:结肠癌。

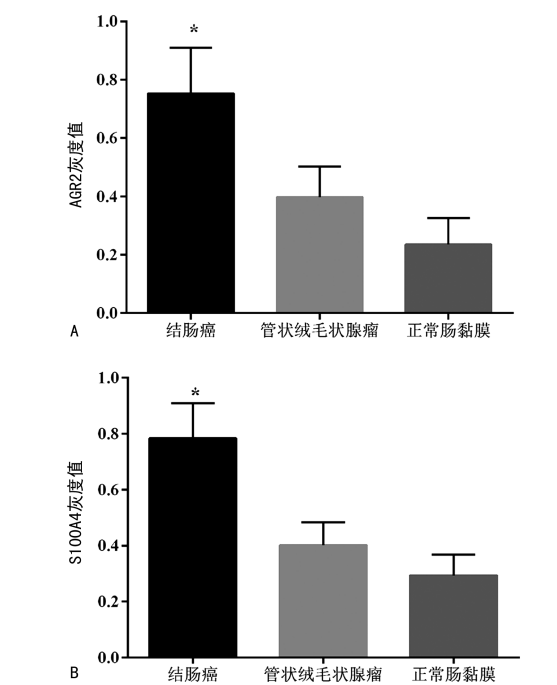
图 1 AGR2 和 S100A4 在 3 种组织的表达

2.2 结肠癌 AGR2 和 S100A4 的相关性分析

通过相关分析发现 AGR2 和 S100A4 在结肠癌中表达呈正相关($r=0.534, P<0.01$),见图 3。

表 1 AGR2 和 S100A4 相对表达量与结肠癌患者临床病理参数的关系($\bar{x}\pm s$)

项目	<i>n</i>	AGR2	<i>t</i> / <i>F</i>	<i>P</i>	S100A4	<i>t</i> / <i>F</i>	<i>P</i>
性别			1.087	0.303		0.803	0.417
男	53	0.77±0.12			0.77±0.09		
女	32	0.73±0.22			0.79±0.14		
年龄(岁)			0.351	0.675		1.382	0.177
<60	36	0.72±0.13			0.79±0.08		
≥60	49	0.78±0.15			0.76±0.11		
肿瘤大小(cm)			1.202	0.227		1.586	0.119
<5	44	0.75±0.07			0.81±0.13		
≥5	41	0.72±0.15			0.76±0.16		
Dukes 分期			24.786	0.000		25.261	0.000
A	10	0.37±0.07			0.34±0.08		
B	34	0.49±0.11			0.50±0.13		
C	22	0.63±0.15			0.66±0.09		
D	19	0.89±0.08			0.87±0.14		
组织分化程度			8.527	0.002		15.477	0.000
低	21	0.87±0.18			0.89±0.12		
中	48	0.62±0.11			0.64±0.13		
高	16	0.32±0.09			0.35±0.07		
淋巴结转移			9.714	<0.000		8.056	<0.000
有	41	0.88±0.19			0.86±0.21		
无	44	0.54±0.13			0.57±0.11		



*: $P<0.05$ 与管状绒毛状腺瘤腺瘤组、正常肠黏膜组比较。
图 2 AGR2 和 S100A4 在 3 种组织相对表达量

2.3 AGR2、S100A4 与结肠癌的临床病理特征的关系

AGR2 和 S100A4 的表达在 Dukes 分期、淋巴结转移和组织分化程度间的差异有统计学意义($P<$

0.05),性别、年龄、肿瘤大小间的差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

2.4 AGR2、S100A4 与结肠癌预后的关系

以 AGR2 与 GAPDH 相对表达水平的平均值为界,将结肠癌患者分为 AGR2 低表达组(37 例)和高表达组(48 例),失访 4 例。AGR2 低表达患者 5 年生存率为 57.14%(20/35),明显高于高表达组患者的 26.09%(12/46),差异有统计学意义($\chi^2=7.825,P=0.004$),见图 4。

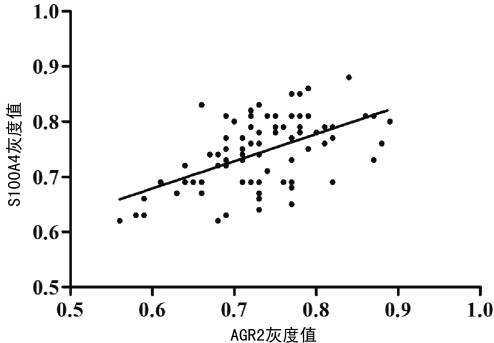


图 3 结肠癌 AGR2 和 S100A4 的相关性分析

以 S100A4 与 GAPDH 相对表达水平的平均值为界,将结肠癌患者分为 S100A4 低表达组(51 例)和高表达组(34 例),失访 4 例。S100A4 低表达患者 5 年生存率为 53.06%(26/49),明显高于高表达组患者

的 28.13% (9/32), 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 6.626$, $P = 0.007$), 见图 4。

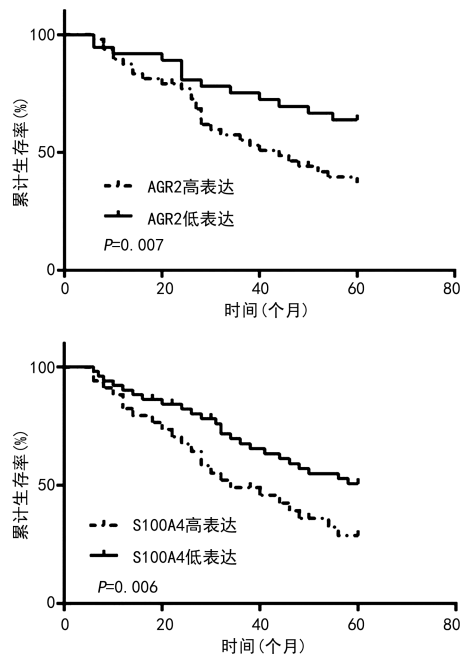


图 4 AGR2、S100A4 表达对患者预后影响的 Kaplan-Meier 生存曲线

3 讨 论

AGR2 蛋白是由位于染色体 7q21.3 的 AGR2 基因编码合成的一种分泌蛋白^[7], 它是一种黏蛋白样分子, 主要存在于含黏液分泌细胞或内分泌细胞的组织中^[8]。在正常肠道中, AGR2 作为肠内稳态的关键调节剂存在于肠分泌上皮细胞的内质网内, 在肿瘤细胞内可通过与 VEGF 和 FGF2 相结合促进 AGR2 同源二聚化, 形成混合的二硫键来调节肠黏蛋白的产生而增强它的活性^[9], 具有促进细胞生长和细胞侵袭转移等多种生物学功能^[10]。自 AGR2 被发现以来已被证实多种肿瘤中过表达, 与肿瘤的发生发展密切相关^[11-13]。它在前列腺癌、乳腺癌、非小细胞肺癌中明显表达上调, 通过与血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA) 直接相互作用或通过核因子- κ B (NF- κ B) 途径增加其转移活性, 促进多种肿瘤的侵袭和转移^[14]。TIAN 等^[12]发现 AGR2 结肠癌中高表达, 在体内和体外均可促进结直肠肿瘤细胞的转移。本研究发现 AGR2 在结肠癌中也呈高表达, 均较管状绒毛状腺瘤及正常黏膜表达明显增高, 与 WEICHERT 等^[13]结果一致。说明 AGR2 在从正常肠黏膜发展到结肠癌的过程中起到了一定的促进作用, 可能为结肠癌发生发展的正向调控因子。

S100A4 蛋白是一种钙结合蛋白, 为 S100 蛋白家族的成员之一, 定位于细胞质和细胞核中, 与细胞中肌动蛋白和肌球蛋白细胞骨架相关^[6], 并在细胞外空间发挥作用。它被证实多种肿瘤细胞中表达, 与肿瘤的侵袭转移密切相关^[15], 且肿瘤侵袭能力越强, 其

表达水平越高。敲除 S100A4 后可明显抑制肿瘤生长速度及侵袭能力^[16], 通过 microRNA-187 下调 S100A4 也能抑制骨肉瘤的发展^[17], 而 S100A4 过表达则可促进胰腺癌的侵袭和转移^[6], 起到促进肿瘤发展的作用。本研究发现 S100A4 在结肠癌中呈高表达, 与 KWAK 等^[18]的研究结果一致, 进一步证实了 S100A4 在肿瘤中为高表达, 与肿瘤的发展密切相关。

本研究结果发现, AGR2 和 S100A4 的高表达与 Dukes 分期、淋巴结转移和组织分化程度相关, 提示 AGR2 和 S100A4 均与结肠癌的侵袭、转移密切相关。且相关分析发现 AGR2 和 S100A4 在结肠癌中表达呈正相关 ($r = 0.5344$, $P < 0.01$), 提示二者在结肠癌的侵袭和转移过程中可能起到相互促进作用, 共同导致结肠癌的转移等发生, 这与刘建捷等^[19]结论一致, 分析可能机制为 AGR2 使 Wnt11 表达上调, 从而激活非经典 Wnt 信号传导通路的下游组蛋白钙/钙调蛋白依赖的蛋白激酶 II (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II, CaMK II) 和 C-Jun 氨基末端激酶 (C-Jun amino-terminal kinase, JNK), 后二者都可调节结直肠肿瘤细胞的迁移^[12], NAIYA 等^[20]研究发现阻断 Wnt 途径后也可使 S100A4 表达明显下调, 从而提示二者都与 Wnt 途径相关并可能通过该途径相互作用, 促进结肠癌的发展。

AGR2 与多种肿瘤的预后密切相关, 其高表达往往提示临床结局较差^[21]。KANG 等^[22]发现 S100A4 与结直肠癌的肿瘤侵袭深度密切相关, 且为结直肠癌患者生存率的独立预测因子。本研究采用 Kaplan-Meier 生存曲线分析发现 AGR2 和 S100A4 高表达患者 5 年生存率明显低于低表达组患者, 由此推测, 二者高表达可能预示着结肠癌患者较低的生存率, 监测结肠癌中的 AGR2 和 S100A4 表达情况, 有助于预测结肠癌患者的预后, 二者可作为结肠癌患者预测 5 年生存率的分子标志物。

综上所述, AGR2 和 S100A4 在结肠癌组织中高表达, 与患者癌症进展及转移、预后密切相关, 因此对结肠癌个体化监测 AGR2 和 S100A4 对了解肿瘤的生物学特征及判断预后有非常重要的意义。

参考文献

[1] 国家卫生计生委医政医管局, 中华医学会肿瘤学分会. 中国结直肠癌诊疗规范 (2017 年版) [J]. 中华胃肠外科杂志, 2018, 21(1): 92-106.

[2] VITELLO E A, QUEK S I, KINCAID H, et al. Cancer-secreted AGR2 induces programmed cell death in normal cells [J]. Oncotarget, 2016, 7(31): 49425-49434.

[3] ONDROUSKOVA E, SOMMEROVA L, NE-

- NUTIL R, et al. AGR2 associates with HER2 expression predicting poor outcome in subset of estrogen receptor negative breast cancer patients[J]. *Exp Mol Pathol*, 2017, 102(2): 280-283.
- [4] ZHANG J, JIN Y, XU S, et al. AGR2 is associated with gastric cancer progression and poor survival[J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(3): 2075-2083.
- [5] DUMARTIN L, ALRAWASHDEH W, TRABULO S M, et al. ER stress protein AGR2 precedes and is involved in the regulation of pancreatic cancer initiation[J]. *Oncogene*, 2017, 36(22): 3094-3103.
- [6] ZHOU Y, LI Z, DING Y, et al. Overexpression of S100A4 protein may be associated with the development and progression of pancreatic cancer[J]. *J Cancer Res Ther*, 2018, 14(Supplement): S159-166.
- [7] RODRÍGUEZ-BLANCO G, ZENEYEDPOUR L, DUIJVESZ D, et al. Tissue proteomics outlines AGR2 AND LOX5 as markers for biochemical recurrence of prostate cancer[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(92): 36444-36456.
- [8] DELOM F, NAZARALIYEV A, FESSART D. The role of protein disulphide isomerase AGR2 in the tumour niche[J]. *Biol Cell*, 2018, 110(12): 271-282.
- [9] GUO H, ZHU Q, YU X, et al. Tumor-secreted anterior gradient-2 binds to VEGF and FGF2 and enhances their activities by promoting their homodimerization[J]. *Oncogene*, 2017, 36(36): 5098-5109.
- [10] DAHAL LAMICHANE B, JUNG S Y, YUN J, et al. AGR2 is a target of canonical Wnt/ β -catenin signaling and is important for stemness maintenance in colorectal cancer stem cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 515(4): 600-606.
- [11] EGELAND E V, BOYE K, PARK D, et al. Prognostic significance of S100A4-expression and subcellular localization in early-stage breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2017, 162(1): 127-137.
- [12] TIAN S, HU J, TAO K, et al. Secreted AGR2 promotes invasion of colorectal cancer cells via Wnt11-mediated non-canonical Wnt signaling[J]. *Expe Cell Res*, 2018, 364(2): 198-207.
- [13] WEICHERT W, TERRACCIANO L, KRISTIANS-EN G. Loss of anterior gradient-2 expression is an independent prognostic factor in colorectal carcinomas[J]. *Eur J Cancer*, 2014, 50(10): 1722-1730.
- [14] JIA M, GUO Y, ZHU D, et al. Pro-metastatic activity of AGR2 interrupts angiogenesis target bevacizumab efficiency via direct interaction with VEGFA and activation of NF- κ B pathway[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2018, 1864(5): 1622-1633.
- [15] DUKHANINA E A, PORTSEVA T N, KOTNOVA A P, et al. The expression level of s100a4 protein affects the migration activity of breast cancer cells[J]. *Dokl Biochem Biophys*, 2019, 485(1): 104-106.
- [16] HUANG L, XU Y, CAI G, et al. Downregulation of S100A4 expression by RNA interference suppresses cell growth and invasion in human colorectal cancer cells[J]. *Oncol Rep*, 2012, 27(4): 917-922.
- [17] XIAO Y, ZHAO Q, DU B, et al. MicroRNA-187 inhibits growth and metastasis of osteosarcoma by downregulating S100A4 [J]. *Cancer Invest*, 2018, 36(1): 1-9.
- [18] KWAK J M, LEE H J, KIM S H, et al. Expression of protein S100A4 is a predictor of recurrence in colorectal cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(31): 3897-3904.
- [19] 刘建捷, 高华, 许新才, 等. 结肠癌中 AGR2 和 S100A4 的表达及临床意义[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2018, 34(4): 436-439.
- [20] NAIYA G, KAYPEE S, KUNDU T K, et al. A Constrained helical peptide against s100a4 inhibits cell motility in tumor cells[J]. *Chem Biol Drug Des*, 2015, 86(4): 945-950.
- [21] PAN F, LI W, YANG W, et al. Anterior gradient 2 as a supervisory marker for tumor vessel normalization induced by anti-angiogenic treatment[J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(3): 3083-3091.
- [22] KANG Y G, JUNG C K, LEE A, et al. Prognostic significance of s100a4 mRNA and protein expression in colorectal cancer[J]. *J Surg Oncol*, 2012, 105(2): 119-124.